內生菌根菌接種源量產技術開發：傳統式砂耕法繁殖體系之建立

程永雄　莊明富

嘉義農業試驗分所

摘　　要

內生菌根菌(Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus，VAMF)證實與許多作物根系具有親和ｔ，當VAMF感染作物根部形成內生菌根時，往往能產生有益效應，促進根群發育，增加根部ｔ磷肥等要素之吸收能力，促進植株生長。惟內生菌根菌是一種活物寄生眞菌，目前尙無法在ｔ工培養基上大量繁殖，接種盆栽宿主植物繁殖內生菌根菌接種源是目前唯一可行途徑。除宿ｔ外，土壤(栽培介質)因子、環境因子等亦可影響內生菌根菌之繁殖。本分所建立之內生菌根ｔ接種源生產體系，分爲三個步驟：(一)以多年生百喜草盆栽保存純種，(二)以盆栽玉米繁殖ｔ種，(三)以大型栽培床之玉米(或營多藤)大量繁殖內生菌根菌，經收集培養土（含宿主根ｔ）風乾裝袋而成接種源。在實際應用上，採用苗期接種，培養洋香瓜內生菌根苗，當內生菌ｔ苗移植於本田，即可將菌種帶到田間，發揮內生菌根之功能，表現其有益效應。

關鍵字：內生菌根菌、盆栽繁殖、量產

前　　言

內生菌根菌對作物生長之有益效應已有許多報告[5,10,13,16,19,20]，包括增加作物對土壤養份之吸收，特別是對土壤中溶解性低之磷肥的吸收、增加水份之吸收，增強耐旱力、提高對病原的抵抗力，減輕病害的發生、提高移植苗的存活率等。雖然使用內生菌根菌有這些好處，但是要在田間實際應用時則需克服接種源取得的問題。由於內生菌根菌爲絕對共生菌，必須依賴宿主才能生長繁殖，至目前爲止尙無法以人工培養基進行繁殖。利用盆栽(Pot culture)適當宿主繁殖接種源是較爲常用的方法[14]，至於要大量生產接種源，加州大學Menge博士則設計有一套繁殖體系可供參考[15]。上述採用多年的接種源生產方式，在使用上已有許多缺點存在，如菌根土體積與重量大，在搬運、儲藏及施用上甚爲不便、需有大量的砂土及空間、及易造成菌種混雜與病原之污染等。至今已有許多學者相繼開發不同的繁殖方法，均是爲克服上述的缺點，如薄層養液栽培法(Nutrient film technique, NFT)[6]、氣霧耕繁殖法(Aeroponic culture)[12]、及根組織繁殖法(Root organ culture)[17]等，均可成功產生內生菌根菌孢子，由於都不利用到土壤(除接種初期外)，因此這些方法可統稱爲無土繁殖法。雖然這些方法解決了土壤的問題，但是離大量生產仍有段差距，接種源的保存與施用也是需要時間研究探討的。因此目前仍需借助傳統式接種源的生產方法，進一步加以改良，以達到縮短生產期間及提高菌土中接種源的密度兩項目標。

本分所在推廣內生菌根菌的應用方面，主要以經濟性高且需移植的作物爲主如洋香瓜等[1]，近年來由於有機農業的推展，及農民配合使用的意願亦高下，推廣面積不斷增加，使得接種源的生產成爲一項大問題。由於接種源的生產受到宿主植物的種類、栽培介質、環境等因子

的影響，且不同的內生菌根菌種類，繁殖的條件可能亦不相同，因此為進行田間接種應用，實有賴於穩定的生產體系配合才能克盡其功。

影響內生菌根菌繁殖之因子

一、 宿主植物：

內生菌根菌的種類分屬於六個屬，至目前為止共有一百四十餘種。除少數幾種尚無法以盆栽繁殖成功外，大多數種類均可以盆栽來繁殖。盆栽繁殖所用之宿主大都依研究人員的習慣而有不同，其中最常使用為宿主有蘇丹草(Sudangrass, *Sorghum vulgare* or *S. bicolor* var. *sudanese*)、百喜草(Bahiagrass, *Paspalum notatum*)、玉米(Corn, *Zea mays*)、地中海苜蓿(Subterranean clover, *Trifolium subterraneum*)或大豆(Soybean, *Glycine max*)等。在本省，研究人員採用作為繁殖宿主之植物種類與國外相類似，如百喜草與玉米，此外太陽麻、紅豆、甘薯亦為研究人員所採用。來自不同繁殖宿主之接種源是否會影響其促進作物生長之效果？Simpson等氏曾比較五種熱帶宿主植物所繁殖之*Glomus clarum*菌種，指出其對作物之生長促進效果並不受接種源來源之影響[21]。但是宿主對產孢的影響則有研究顯示，宿主種類對內生菌根菌孢子產生有影響[23]。而宿主種類對孢子產生之影響可能與宿主根系多寡及形成菌根之程度，以及宿主之生長期長短有關。

筆者亦曾比較玉米、營多藤、百喜草、百香果、洋香瓜等五種植物，其對內生菌根菌產孢之影響[1]。結果顯示接種後三個月，以洋香瓜菌根形成率最高，每百毫升砂土之孢子數亦最高，百喜草之菌根形成率是供試宿主中的第三位，但每百毫升之孢子數則是第二僅次於洋香瓜，玉米之菌根形成率雖然最高，但是百毫升砂土之孢子數則是第三位，而百香果與營多藤在菌根形成率與孢子數上則較差，此種結果可能與宿主生長速度有關。因為由盆栽植株生長情形觀察，玉米、洋香瓜、百喜草是生長較快速之植物，因此當內生菌根菌感染後，可隨著宿主快速生長繁殖。因此要在短時間大量繁殖接種源須考慮宿主的生長速度及根系的多寡，但是如果依保存菌種的觀點，選擇多年生的宿主可能是較方便，且如多年生的百喜草分株移植相當方便，在繁殖原種時可省去重新接種之步驟。

二、 土壤(栽培介質)因子：

土壤因子對內生菌根菌之影響包括：孢子發芽、菌根形成、產孢、孢子存活等。這些因子有土壤質地(Soil texture)、酸鹼值(pH)、水份含量、有機質(Organic matters)、肥份(Fertility)、土壤微生物(Soil microorganisms)等[3,4,8,11,18,22,24,25]。由於研究報告較缺乏加上土壤因子相當複雜，因此至今尚無有系統的研究。但是可以推測的是，從內生菌根菌孢子發芽開始至其產孢間是一系列的過程，只要其中一個步驟受影響，都會影響最終之產孢數量。

一般認為土壤肥份對內生菌根菌的繁殖是較為不利的,因此在本分所是選擇低肥份之河砂(西螺),作為栽培介質種植宿主植物繁殖內生菌根菌接種源。河砂除肥份較低外，

其質地屬於砂質土，在以篩網傾注法[7]洗出孢子時亦較容易觀察。但是以河砂爲介質時，必須施用肥料提供繁殖宿主之養份需求。施用一般化學肥料於砂質土，則有肥份容易流失的缺點，目前有一種緩效性肥料(Controlled-release fertilizer)可供使用，Coltman等氏[2]的報告中，施用緩效性肥料較Modified 強生營養液產生的孢子爲多。除施用化學肥料外，加入適當的有機質，亦有助於一些菌種的產孢。但是一般商品化有機質常在其中添加一些化學肥料，可能造成不利產孢的結果。除了以河砂爲栽培基質外，中興大學楊秋忠教授也使用石英砂作爲基質繁殖內生菌根菌，但是不論是砂土或石英砂，重量大是主要缺點，在加拿大目前有利用Polymeric hydrogel爲基質生產內生菌根菌接種源，並使用於微體繁殖草莓(Micropropagated strawberry)之栽培。另外一種方式是可將砂土繁殖之菌種以篩網傾注法洗出後，再以擴張性黏土(Expandable clay)爲基質吸附孢子，即可減輕重量，此種方式在以氣霧耕繁殖之接種源，亦是可以使用，且可省去洗出孢子的步驟。

三、 環境因子

環境因子中溫度、光照[9]均可影響內生菌根菌的生長發育。由於內生菌根菌與宿主植物是一種共生狀態，必需由宿主提供養份才能生長發育，有適宜宿主生長的環境條件，才能使宿主製造足夠的有機養份提供內生菌根菌生長所需，因此影響宿主生長的環境因子同樣對內生菌根菌的生長也有影響。

在本分所生產之內生菌根菌接種源是以苗床栽培(Nursery culture)大量生產接種源，方式是以空心磚圍成的小區域，置入砂土後再種植已接種內生菌根菌之玉米，繁殖時間採適宜種植玉米之春、秋兩季。除了採用玉米作爲生產接種源之宿主植物外，另外亦利用營多藤(Beggarlice)爲宿主植物，但是營多藤在本省冬季時生長緩慢，夏季時較適宜作爲繁殖宿主，百喜草的情形亦同，但由於後兩種植物爲多年生，可作爲原原種或原種菌根菌之繁殖宿主。

營多藤屬於豆科植物，其根系可形成根瘤，因此如果同時接種優良的內生菌根菌及固氮根瘤菌，即可同時繁殖此兩種有益微生物，應用於豆科作物之接種。

內生菌根菌接種源繁殖體系

本分所推廣應用內生菌根菌於洋香瓜之栽培始於1986年，之前亦曾試過玉米及大豆之田間接種試驗。目前在洋香瓜的推廣應用面積已達300公頃(1993-1994)，如此龐大的面積所需的菌土量估計約有13.5噸，此一數據是以苗期接種用量爲基礎，如果不是苗期接種而是於洋香瓜直播時再接種，菌土量約是苗期用量的2至3倍。繁殖之菌土除了供推廣應用所需，平時亦有農民直接至本分所索取菌土，因此爲充份供應內生菌根菌菌土，必須利用現有的空間作充份的利用。如果推廣的菌種有數種，則將造成人力、空間、時間分配的大問題。目前農業試驗所吳繼光博士正在蒐集台灣內生菌根菌菌種，期望建立囊叢枝內生菌根菌之種源中心，亦即是生產菌種之上游工廠，但是中、下游等生產原種及接種源之工作同樣也很重要，否則徒有優良菌種卻無法提供田間應用，因此此一工作有賴團隊合作才能事半功倍。

目前本分所建立之接種源生產體系，是採用盆栽百喜草作爲生產原原種或原種內生菌根菌，或以大型盆缽種植玉米生產原種內生菌根菌。所生產的原原種內生菌根菌保存於實驗室中，假若原種有混雜時，再取出重新繁殖或於保存一年後重新更新繁殖。田間推廣應用所需的接種源則取原種內生菌根菌菌土，接種玉米或營多藤，植株再移植於以空心磚圍成之大型栽培床大量繁殖。當玉米開花結果後任其自然乾枯，再割去地上部，所有土壤則搬運到遮陰蓬下自然陰乾，再裝袋(4.5kg/袋)。封袋後放置在大型冷藏庫中(4-5℃)保存。由於推廣面積不斷增加，爲減輕本分所人力、空間上之不足，目前正將部份接種源生產工作轉移苗栗縣後龍鎮一位農友處，該處生產之接種源則提供北部地區推廣所需，而本分所則負責提供中南部地區所需之接種源。

過去以砂土生產之接種源，在人工接種上尚未有問題出現，但是育苗工作在未來可能逐漸改採自動化方式進行，以因應農村勞力不足現象，如何使菌土適合在機器上自動填加，是未來研究的方向。

結　論

近年來在環保意識提昇下，減少化學肥料及化學藥劑的使用已逐漸形成一種趨勢。有機農業的觀念即在這種趨勢下順勢推展。但是要施肥習慣已成定型的農民改變其習慣，可能不是在短時間內可以達到的，其中一個原因即是化學肥料相當便宜，另一個原因是如果教農民少施化學肥料，會令其有作物少施肥料怎能長得好的疑慮？因此一方面教農民少施肥料的同時，也須教導他們如何配合使用微生物肥料，如固氮根瘤菌、溶磷菌、菌根菌等，當農民瞭解施少量肥料，卻又不會影響作物生長時，才能建立農民少施化學肥料的信心。

以內生菌根菌的推廣應用而言，除了菌種的來源外，接種源的大量繁殖即是一項龐大工作，因爲內生菌根菌不像固氮根瘤菌可在人工培養基上大量繁殖，也無法在短時間內即能生產大量接種源，因此推展內生菌根菌的使用，需要團隊合作，從菌種蒐集、分離純化到大量培養有待分工合作、相互配合，才能事半功倍。

本分所在推展內生菌根菌應用於洋香瓜生產上已有多年，顯示內生菌根菌可促進洋香瓜根群發育、促進植株生長並可提早植株開花結果（圖一）。供應此一示範推廣所用之接種源，即是依據如下之接種源大量繁殖體系，（一）以多年生百喜草盆栽保存純化菌種，（二）以玉米或百喜草盆栽繁殖原種，（三）再以大型栽培床種植玉米或營多藤大量繁殖接種源，提供田間300公頃洋香瓜接種所需。但由於人力、空間的不足，目前正將部份接種源大量繁殖的工作轉移農民，因爲內生菌根菌的種類有很多，許多具有應用潛力的菌種尙待開發，因此本分所將致力於內生菌根菌原種的繁殖，菌種除由農業試驗所提供外，也將自行分離純化培養，未來可提供有興趣的單位研究之需。

圖一、內生菌根菌對洋香瓜生長及生產之影響
1. 簡易網室內培育之內生菌根洋香瓜苗 2. 內生菌根洋香瓜苗根系生長旺盛
3. 內生菌根洋香瓜(右)生長較未接種之對照株(左)高 4. 內生菌根洋香瓜結果情形

參考文獻

1. 程永雄、莊明富、杜金池 1993 內生菌根菌*Glomus clarum*應用在洋香瓜生產上之效益評估。中華農業研究 42：74-84。
2. Coltman, R. R., D. R. Waterer, and R. S. Huang.1988. A simple method for production of *Glomus aggregatum* inoculum using controlled-release fertilizer. HortScience 23:213-215.
3. Daniels, B. A., and J. A. Menge. 1980. Hyperparasitization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Phytopathology 70:584-588.
4. Daniels, B. A., and S. O. Greham. 1976. Effects of nutrition and soil extracts on germination of *Glomus mosseae* spores. Mycologia 68:108-116.
5. Dehne, H. W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology 72:1115-1119.
6. Elmes, R. P., and B. Mosse. 1984. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. Ⅱ. Experiments with maize(*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. Can. J. Bot. 62:1531-1536.
7. Gerdemann, J. W., and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc. 46:235-244.
8. Graham, J. H., and L. W. Timmer. 1984. Vesicular-arbuscular mycorrhizal development and growth response of rough lemon in soil and soilless media: Effect of phosphorus source. J. Am. Soc. Hort. Sci. 109:118-121.
9. Graham, J. H., R. T. Leonard, and J. A. Menge. 1982. Interaction of light intensity and soil temperature with phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. New Phytol. 91:683-690.
10. Harley, J. L., and S. E. Smith. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, New York, p. 483.
11. Hayman, D. S. 1982. Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Phytopathology 72:1119-1125.
12. Hung, L. L., and D. M. Sylvia. 1988. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. Appl. & Envir. Microbiol. 54:353-357.
13. Hussey, R. S., and R. W. Roncadori. 1982. Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. Plant Dis. 66:9-14.
14. Menge, J. A. 1984. Inoculum production. Pages 187-203 In: VA Mycorrhiza, C. L. Powell and D. J. Bagyaraj. eds. CRC Press, Boca Raton, Fl. 234 pp.
15. Menge, J. A. 1983. Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. Can. J. Bot. 61:1015-1024.
16. Mosse, B. 1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Ann. Rev. Phytopathol. 11:171-196.
17. Mugnier, J., and B. Mosse. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. Phytopathology 77:1045-1050.

18. Plenchette, C., V. Furlan, and J. A. Fortin. 1982. Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. J. Am. Soc. Hort. Sci. 107:535-538.

19. Powell, C. L., and D. J. Bagyaraj. 1984. VA Mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton, Fl. 234pp.

20. Schenck, N. C. 1981. Can mycorrhizae control root disease? Plant Dis. 65:231-234.

21. Simpson, D., and M. J. Daft. 1990. Spore production and mycorrhizal development in various tropical crop hosts infected with *Glomus clarum*. Plant and Soil 121:171-178.

22. Smith, G. S., and R. W. Roncadori. 1985. Responses of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi at four soil temperature and their effects on cotton growth. New Phytol. 104:89-95.

23. Struble, J. E., and H. D. Skipper. 1988. Vesicular- arbuscular mycorrhizal fungal spore production as influenced by plant species. Plant and Soil 109:277-180.

24. Thommerup, I. C. 1985. Inhibition of spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Trans. Br. Mycol. Soc. 85:267-278.

25. Wilson, G. W. T., B. A. Daniels Hetrick, and D. Gerschefske Kitt. 1989. Suppression of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spore germination by nonsterile soil. Can. J. Bot. 67:18-23.

討　論

中興大學吳文川教授問：

內生菌根菌有沒有其它微生物，如眞菌、細菌、病毒的感染，假若有它或它們也有可能影響內生菌根菌的生產。

農試所嘉義分所分所長程永雄博士答：

生物不管在空氣中、土壤中或任何地方存在，都會遭遇到一物剋一物的命運，我想內生菌根菌一定會被其他微生物寄生或感染，即所謂的超寄生(Hyperparastism)。細菌方面從掃描電子顯微鏡來看，厚膜孢子看起來雖然那麼圓、那麼的光滑，仍附著很多的細菌，但是這些細菌在一起如果是相安無事就沒關係，事實上沒有完全是無菌的狀態的。所以利用根組織培養VAM眞菌，在培養基上就要克服孢子消毒問題。消毒不好時，孢子就不發芽，我想與其他微生物之感染有關係。

Development of Mass Production of VAMF Inoculum by Sand Culture

Y. H. Cheng and M. F. Chuang
Chiayi Agricultural Experiment Station, TARI

Abstract

The vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus was proved to have the compatibility with root systems of many crops. Formation of VA mycorrhiza in root systems of crops infected by VAM fungus could arise beneficial effects, i.e. promoted the growth and development of root systems, increased the absorption of soil mineral elements, enhanced the top growth of crops. Up today, the common method for propagation of VA mycorrhizal fungi were pot culture because they were obligate symbionts. Factors affected the propagation of VA mycorrhizal fungi in pot culture included host plants, soil(culture media), and environment. We developed a procedure for propagation of VAM fungus inoculum as follows: 1. maintaining the pure VA mycorrhizal fungus in pot culture of bahiagrass, 2. propagation of VAM fungus in pot culture of corn, 3. mass production of VA mycorrhizal fungus inoculum in sand bed culture of corn or beggarlice, 4. air-drying and bagging the harvested culture soil including the segments of infected root systems of host plants and fungal chlamydospores. Method for application of VA mycorrhizal fungus to field was by transplanting mycorrhizal seedlings of muskmelon pre-inoculated with infested soil in plastic net house. When the mycorrhizal seedlings were transplanted to the field, mycorrhizal root systems could show beneficial effects to muskmelon production.

Key words: Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, Pot culture, Mass production